

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXX
1923

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXII.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1923

Chimica fisiologica. — *La preparazione della così detta « insulina » e la sua azione* (1). Nota dei proff. UBALDO SAMMARTINO e DOMENICO LIOTTA, presentata dal Corrisp. LO MONACO (2).

Nel 1889 von Mering e Minkowski in Germania e De Dominicis in Italia avevano osservato che gli animali, dopo completa estirpazione del pancreas, presentavano una glicosuria rilevante e morivano in qualche settimana con fenomeni di esaurimento. In seguito Sandemeyer, Thiroloix, Jacob, Allen, Hédon, ecc., lasciando negli animali una parte del pancreas, poterono ottenere un quadro morboso ad andamento più cronico, che ricordava in certo modo il decorso del diabete umano.

Con l'indagine dei rapporti intercedenti fra il pancreas e il ricambio degl'idrati di carbonio (Conheim, Stoklasa, Fränkel, ecc.) si precisò fin d'allora il concetto che dal pancreas fosse secreta una sostanza attiva, capace di influenzare il metabolismo di questi composti ternari.

Un nuovo progresso in questa complessa questione veniva segnato da Lépine, Arthus, Solvay, Slosse, Van de Put e De Meyer con lo studio della glicolisi in vitro. Seguirono anni di arresto e di esperienze contraddittorie per l'impossibilità di isolare l'ormone pancreatico.

I tentativi di Zuelzer, Kleiner, Paulesco di ridurre il tasso glicemico con estratti acquosi ed emulsioni di pancreas diedero risultati poco netti.

Nè più incoraggiante si dimostrò l'azione di un estratto alcoolico preparato da Scott. L'esistenza dell'ormone rimaneva non dimostrata.

La questione è stata ripresa dal punto di vista sperimentale da Banting e Best a Toronto nel laboratorio di Macleod.

Partendo dalla premessa che la scarsa efficacia degli estratti preparati dai precedenti sperimentatori fosse dovuta alla distruzione della sostanza attiva per opera della tripsina, gli AA. prepararono estratti con soluzioni di Ringer a bassa temperatura dal pancreas di giovani feti ancora sprovvisti di fermenti triptici e da pancreas residuali, dopo allacciatura dei dotti pancreatici per 10 settimane. Ma poichè questi estratti, sebbene efficaci, determinavano un'azione locale nel punto dell'iniezione, essi, riuscirono ad evitarla preparando insieme con Collip, estratti alcoolici da pancreas normali di bue, maiali e pecore, che ottennero puri per mezzo di precipitazioni frazionate.

Noi, seguendo il metodo descritto, scarso di dettagli, dai fisiologi canadesi, dopo molti tentativi di preparazione dell'insulina, adoperando pancreas

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica fisiologica della R. Università di Roma.

(2) Pervenuta all'Accademia il 25 giugno 1923.

di cane, di cavallo, e di bue, abbiamo trovato che il pancreas di cavallo dà un migliore rendimento sia per quantità sia per attività dell'estratto.

Il metodo da noi adoperato, che, come abbiamo detto, non si differenzia da quello di Banting e Best che in piccoli dettagli, è il seguente:

Al pancreas finamente triturato si aggiungono parti eguali di alcool a 80°. La miscela viene agitata di tanto in tanto e dopo parecchie ore filtrata. Al filtrato si aggiungono alcuni volumi (2) di alcool a 95° per precipitare le proteine. Il filtrato si porta a piccolo volume nel vuoto a bassa temperatura e successivamente è trattato con etere più volte per allontanare i grassi e i lipoidi. Si concentra di nuovo in vuoto, si riprende con alcool a 80° e si centrifuga. Lo strato sovrastante del tubo di centrifuga viene pipettato e precipitato con alcool assoluto. Dopo alcune ore il principio attivo è tutto precipitato. Si raccoglie e si scioglie in acqua distillata alla concentrazione voluta, e si porta ad un'acidità eguale a CH 5-6. Si fa passare attraverso a filtro Berkefeld, si controlla per la sterilità ed è così pronta per gli usi clinici.

L'insulina da noi ottenuta presenta lievissime tracce di sostanze proteiche: sono leggermente positive le reazioni col reattivo di Millon, quella del biureto, e quella di Adamkiewicz-Hopkins-Cole.

In soluzione acquosa e alla C. H. 5-6 è attiva fino a 9 giorni, se conservata in luogo fresco. È possibile con speciali accorgimenti di prostrarne più a lungo l'efficacia.

Con questo estratto noi abbiamo sperimentato su cavie, conigli e anche in un gravissimo caso di diabete umano complicato da infezione settica (favo del collo). Abbiamo stabilito volta per volta la dose unità dell'estratto.

È noto infatti che il rendimento della sostanza del pancreas varia nelle preparazioni; e anche adoperando lo stesso metodo si possono ottenere delle sostanze più o meno efficaci. Tuttavia è bene notare che si deve parlare di insulina solo quando si ha un estratto capace di abbassare il tasso glicemico di un coniglio normale di un Kg., preso come controllo (*insulina testo* di Macleod) sino a gr. 0,045 % di sangue e di determinare l'ipoglicemia col corteo di tutti quei sintomi caratteristici descritti dagli AA. canadesi.

Dei nostri esperimenti che furono cominciati nel mese di febbraio del corrente anno ci riserviamo di pubblicare i protocolli e le grafiche. Qui ci limitiamo a dire che l'iperglicemia nei conigli resi diabetici scende al disotto del tasso normale, che la glicemia nei conigli normali dopo qualche ora dall'iniezione di insulina scende da 80-110 mg. % talora fino a 12-13 mg. %, analogamente alle osservazioni dei medici americani, inglesi e francesi.

Contemporaneamente all'abbassarsi della glicemia, i conigli presentano una sindrome speciale sempre costante, caratterizzata dai seguenti fenomeni: il coniglio, che è rimasto digiuno da 15-20 ore, dopo pochi minuti da che

ha ricevuto l'iniezione della dose unita di insulina, si mostra irrequieto e gira per la stanza fiutando come se cercasse il cibo. Gradatamente perde la sua vivacità, diventa apatico e non risponde agli stimoli meccanici, come se le sue forze diminuissero. Infatti la testa è abbandonata, gli arti posteriori sono divaricati, e per tutto il corpo si notano movimenti fibrillari. Facilmente egli cade su un fianco, e se spinto a muoversi, con stento allora si rimette in piedi.

Dopo questo quadro, mai prima di 45-60 minuti dall'iniezione, esplodono i sintomi nervosi che s'iniziano con l'estensione tonica degli arti sia anteriori che posteriori, e sono poi seguiti da un movimento di rotazione quasi completo di tutto il corpo sull'asse longitudinale prima da destra a sinistra e subito dopo da sinistra a destra. Questo movimento, che si presenta più volte a brevi intervalli e che non indica una prevalenza di una metà del corpo sull'altra, è il fenomeno più caratteristico che si osserva nei conigli dopo l'iniezione di insulina. Evidentemente esso è di natura centrale ed è dovuto a fatti di eccitamento di breve durata, poichè il coniglio dopo pochi (3-4) movimenti di rotazione, si rimette in posizione normale. La morte dell'animale segue in uno stato di rilasciamento generale con sospensione dei sintomi nervosi, se non s'interviene con l'iniezione di una soluzione concentrata di glicosio o di saccarosio.

Alla sezione i conigli morti per insulina non presentano fatti rilevanti negli organi viscerali. Si sono trovate lievi iniezioni vasali a carico degli intestini e dello stomaco, e qualche volta chiazze emorragiche nel rene, nel cieco e nella sottosierosa peritoneale. Però questi reperti sono assai rari.

Il fatto che le iniezioni concentrate di glicosio e di altri zuccheri rimettono l'animale già fortemente ipoglicemico e in preda ai fatti nervosi su riferiti, ci ha spinti a vedere se su questa guarigione influisse l'azione da noi e da altri allievi della Scuola di Chimica fisiologica della R. Università di Roma esaurientemente dimostrata sulla costrizione vasale degli zuccheri, e non quella compensatoria della perdita del tasso glicemico normale, dovuta all'insulina e ammessa dagli AA. canadesi.

Non potendo in favore della nostra ipotesi portare il risultato registrato da Banting, Best e Macleod, i quali ottennero la guarigione dei conigli iniettati con insulina per mezzo dell'adrenalina, perchè questa, pur avendo un'azione vaso-costrittrice, determina una forte mobilitazione del glicogeno epatico, noi ci siamo serviti come vaso-costrittori dell'ergotina e della pituitrina (estratto del lobo posteriore dell'ipofisi).

Queste esperienze hanno dato esito negativo, e i conigli sono morti. Ne deduciamo quindi che l'azione vaso-costrittrice degli zuccheri non influisce sulla guarigione degli animali.

Potevano però gli zuccheri agire sulla pressione sanguigna, e per dimostrare ciò abbiamo misurata questa con un manometro a mercurio.

Le grafiche hanno mostrato che per effetto dell'insulina iniettata sottocute o nelle vene la pressione sanguigna si abbassa notevolmente in modo lento e graduale, riducendosi di 20-30 mm. o più di mercurio e che una susseguente iniezione endovenosa di glicosio nella quantità di 1 gr. per Kg. — dosi indicate da Banting e Best — non è stata capace di rialzare la pressione nè di evitare un ulteriore abbassamento. Ci è sembrato che con l'abbassarsi della pressione diminuisca parallelamente la temperatura rettale che nel nostro caso raggiunse il livello minimo di 35-36° C.

Ci riserviamo in susseguenti Note di riferire i risultati di esperienze in corso istituite allo scopo di precisare meglio il meccanismo di azione dell'insulina.

G. C.